

CON. USSN 10/481,087

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003年2月6日 (06.02.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/010187 A1

- (51) 国際特許分類: C07K 1/02, 5/06,
C12P 21/00, 21/02, C12N 9/48, 15/57
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/07633
- (22) 国際出願日: 2002年7月26日 (26.07.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2001-226568 2001年7月26日 (26.07.2001) JP
特願2001-310547 2001年10月5日 (05.10.2001) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 味の素株式会社 (AJINOMOTO CO., INC.) [JP/JP]; 〒104-8315 東京都中央区京橋一丁目15番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 野崎 博之 (NOZAKI,Hiroaki) [JP/JP]; 〒210-8681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1番1号 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 吉良 郁夫 (KIRA,Ikuo) [JP/JP]; 〒210-8681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1番1号 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 鈴木 園子 (SUZUKI,Sonoko) [JP/JP]; 〒210-8681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1番1号 味の素株式会社内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 酒井 宏明 (SAKAI,Hiroaki); 〒100-0013 東京都千代田区霞ヶ関三丁目2番6号 東京俱楽部ビルディング Tokyo (JP).
- (81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

[続葉有]

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING DIPEPTIDE, L-AMINO ACID AMIDE HYDROLASE TO BE USED THEREIN AND PROCESS FOR PRODUCING L-AMINO ACID AMIDE HYDROLASE

(54) 発明の名称: ジペプチドの製造方法、それに用いるL-アミノ酸アミドハイドロラーゼ、および、L-アミノ酸アミドハイドロラーゼの製造方法

(57) Abstract: It is intended to provide a process whereby a dipeptide is produced via an industrially advantageous and convenient pathway starting with relatively less expensive materials. A dipeptide is produced from an L-amino acid amide and an L-amino acid with the use of a culture of a microorganism capable of producing the dipeptide from the L-amino acid amide and the L-amino acid or optionally processed microbial cells separated from the culture.

(57) 要約:

比較的安価に入手可能な出発原料を用いて、工業的に有利かつ簡便な経路でジペプチドを製造する方法を提供する。L-アミノ酸アミドとL-アミノ酸とからジペプチドを生成する能力を有する微生物の培養物、該培養物より分離した微生物菌体、または、該微生物の菌体処理物を用いて、L-アミノ酸アミドおよびL-アミノ酸からジペプチドを製造する。

WO 03/010187 A1



- 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受
領の際には再公開される。
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

明細書

ジペプチドの製造方法、それに用いるL-アミノ酸アミドハイドロラーゼ、および、L-アミノ酸アミドハイドロラーゼの製造方法

5

技術分野

本発明は、複雑な合成方法を経ることなく、簡便かつ安価にジペプチドを製造する方法に関し、より詳細には、L-アミノ酸アミドとL-アミノ酸とからジペプチドを製造する方法、当該ジペプチドの製造方法に使用するL-アミノ酸アミドハイドロラーゼおよびその製造方法に関する。

10

背景技術

ジペプチドは、医薬品素材、機能性食品等のさまざまな分野で利用されている。例えば、L-アラニル-L-グルタミンは無血清培地の成分として有用であり。L-グルタミンに比べ安定で、水溶性も高いことから輸液成分に用いられる。

ジペプチドの製造法としては従来から化学合成法が知られているが、その製造法は必ずしも簡便なものではなかった。例えば、N-ベンジルオキシカルボニルアラニン（以下Z-アラニンと称する）と保護L-グルタミンを用いる方法（Bu 11. Chem. Soc. Jpn., 34, 739(1961)、Bull. Chem. Soc. Jpn., 35, 1966(1962)）、Z-アラニンと保護L-グルタミン酸-γ-メチルエステルを用いる方法（Bull. Chem. Soc. Jpn., 37, 200(1964)）、Z-アラニンエステルと無保護グルタミン酸を用いる方法（特開平1-96194号公報）、2-置換-プロピオニルハロイドを原料として、N-（2-置換）-プロピオニルグルタミン誘導体を中間体として合成する方法（特開平6-234715号公報）等が知られている。

しかしながら、いずれの方法においても、保護基の導入脱離、もしくは中間体の合成が必要であり、工業的に有利で十分に満足できる製造方法ではなかった。また、微生物酵素系を用いたジペプチドの製造法としては、Z-アスパラギン

酸とフェニルアラニンのメチルエステルを用いる方法（特開昭53-92729号公報）、アスパラギン酸アミドとフェニルアラニンのメチルエステルを用いる方法（特開平10-136992号公報）が知られている。その他、酵素的プロセスによってジペプチドを生産する方法としてEPA0278787、WO90/01555が知られている。

しかしながら、いずれの微生物酵素系においても、出発物質として保護基のついたアミノ酸を用いる必要があり、比較的安価に入手可能な原料を用いて、工業的に有利かつ簡便な経路でジペプチドを製造する方法の開発が望まれていた。

10 発明の開示

本発明は、比較的安価に入手可能な出発原料を用いて、工業的に有利かつ簡便な経路でジペプチドを製造する方法を提供することを目的とする。

上記目的に鑑み銳意研究を重ねた結果、本発明者らは、ある種の微生物が、比較的安価に入手可能なL-アミノ酸アミドとL-アミノ酸からジペプチドを生成する能力を有することを見出し、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は、以下のとおりである。

[1] L-アミノ酸アミドハイドロラーゼ活性を有する酵素または酵素含有物を用いて、L-アミノ酸アミドおよびL-アミノ酸からジペプチドを製造することを特徴とするジペプチドの製造方法。

20 [2] 前記酵素または酵素含有物が、L-アミノ酸アミドハイドロラーゼ活性を有する微生物の培養物、該培養物より分離した微生物菌体、および、該微生物の菌体処理物からなる群より選ばれる1種または2種以上であることを特徴とする、上記[1]に記載のジペプチドの製造方法。

25 [3] 前記微生物は、バチルス属、コリネバクテリウム属、エルビニア属、ロドコッカス属、クリセオバクテリウム属、ミクロコッカス属、シュードモナス属、クリプトコッカス属、トリコスボロン属、ロドスピリジウム属、スポロプロマ・イセス属、トレメラ属、トルラスピラ属、ステリグマトイセス属またはロドトイセス属、

ルラ属に属することを特徴とする上記〔2〕に記載のジペプチドの製造方法。

〔4〕 前記酵素が、下記(A)または(B)のタンパク質である、上記〔1〕に記載のジペプチドの製造方法。

(A) 配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

5 (B) 配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列を有し、かつ、L-アミノ酸アミドとL-アミノ酸からジペプチドを生成する反応を触媒するL-アミノ酸アミドハイドロラーゼ活性を有するタンパク質。

10 〔5〕 前記酵素が、下記(C)のDNAでコードされるタンパク質である、上記〔1〕に記載のジペプチドの製造方法。

15 (C) 配列表の配列番号4に記載の塩基番号57～1295の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジエントな条件でハイブリダイズし、かつL-アミノ酸アミドとL-アミノ酸からジペプチドを生成する反応を触媒するL-アミノ酸アミドハイドロラーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA。

〔6〕 前記微生物が、下記(A)(B)または(C)のタンパク質を発現可能に形質転換された微生物である、上記〔2〕に記載のジペプチドの製造方法。

(A) 配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

20 (B) 配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列を有し、かつ、L-アミノ酸アミドとL-アミノ酸からジペプチドを生成する反応を触媒するL-アミノ酸アミドハイドロラーゼ活性を有するタンパク質。

25 (C) 配列表の配列番号4に記載の塩基番号57～1295の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジエントな条件でハイブリダイズし、かつL-アミノ酸アミドとL-アミノ酸からジペプチドを生成する反応を触媒するL-アミノ酸アミドハイドロラーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAでコードされるタンパク質。

[7] 前記L-アミノ酸アミドは、L-アラニンアミド、グリシンアミドおよびL-アスパラギン酸- α -アミドからなる群より選ばれる1種または2種以上であることを特徴とする上記〔1〕から〔6〕のいずれか1項に記載のジペプチドの製造方法。

〔8〕 前記L-アミノ酸は、L-グルタミン、L-アスパラギン、グリシン、L-アラニン、L-バリン、L-ロイシン、L-イソロイシン、L-メチオニン、L-プロリン、L-フェニルアラニン、L-トリプトファン、L-セリン、L-スレオニン、L-チロシン、L-リジン、L-アルギニン、L-ヒスチジンおよびL-グルタミン酸からなる群より選ばれる1種または2種以上であることを特徴とする上記〔1〕から〔7〕のいずれか1項に記載のジペプチドの製造方法

〔9〕 エルビニア属、ロドコッカス属、クリセオバクテリウム属、ミクロコッカス属、クリプトコッカス属、トリコスプロロン属、ロドスピリジウム属、スプロロマイセス属、トレメラ属、トルラスピラ属、ステリグマトイセス属またはロドトルラ属に属する微生物から得られ、かつ、L-アミノ酸アミドとL-アミノ酸からジペプチドを生成する反応を触媒することを特徴とするL-アミノ酸アミドハイドロラーゼ。

〔10〕 エルビニア属、ロドコッカス属、クリセオバクテリウム属、ミクロコッカス属、クリプトコッカス属、トリコスプロロン属、ロドスピリジウム属、スプロロマイセス属、トレメラ属、トルラスピラ属、ステリグマトイセス属またはロドトルラ属に属する微生物を培地中で培養し、培地中および/または細胞中にL-アミノ酸アミドとL-アミノ酸からジペプチドを生成する反応を触媒するL-アミノ酸アミドハイドロラーゼを蓄積させることを特徴とするL-アミノ酸アミドハイドロラーゼの製造方法。

〔11〕 下記(A) (B) または(C)のタンパク質を発現可能に形質転換された微生物を培地中で培養し、培地中および/または細胞中にL-アミノ酸アミドとL-アミノ酸からジペプチドを生成する反応を触媒するL-アミノ酸アミド

ハイドロラーゼを蓄積させることを特徴とするL-アミノ酸アミドハイドロラーゼの製造方法。

(A) 配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質

(B) 配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のア
5 ミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列を有し、かつ、
L-アミノ酸アミドとL-アミノ酸からジペプチドを生成する反応を触媒するL
-アミノ酸アミドハイドロラーゼ活性を有するタンパク質

(C) 配列表の配列番号4に記載の塩基番号57～1295の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジメントな条件でハイブリダイ
10 ズし、かつL-アミノ酸アミドとL-アミノ酸からジペプチドを生成する反応を触媒するL-アミノ酸アミドハイドロラーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAでコードされるタンパク質

図面の簡単な説明

15 第1図は、本発明のジペプチドの製造工程を示すフローチャートである。

第2図は、コリネバクテリウム・グルタミカムATCC13286由来のL-アミノ酸アミドハイドロラーゼの至適pH曲線を示す図である。

第3図は、コリネバクテリウム・グルタミカムATCC13286由来のL-アミノ酸アミドハイドロラーゼの至適温度曲線を示す図である。

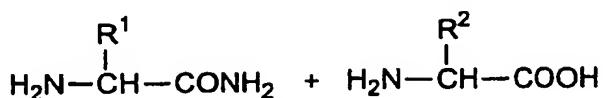
20

発明を実施するための最良の形態

本発明のジペプチドの製造方法は、L-アミノ酸アミドとL-アミノ酸とからジペプチドを生成する能力を有する酵素または酵素含有物、具体的には、L-アミノ酸アミドとL-アミノ酸とからジペプチドを生成する能力を有する微生物の培養物、該培養物より分離した微生物菌体、または、該微生物の菌体処理物を用いることを特徴とする。本発明のジペプチドの製造方法における反応は下記反応式により表される。下記化学式に例示されるように、本明細書において「ジペプ

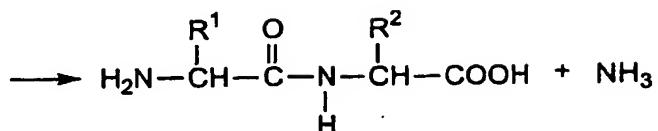
チド」とは、ペプチド結合を1つ有するペプチドポリマーのことをいう。

(化学式1)



L-アミノ酸アミド

L-アミノ酸



- 5 (R¹はL-アミノ酸アミドのアミノ酸側鎖を、R²はL-アミノ酸のアミノ酸側鎖を表す。)

アミノ酸アミドは、市販品として比較的安価に入手可能な化合物である。アミノ酸アミドと無保護アミノ酸を出発原料として用いる本発明の方法は、従来はない全く新しいジペプチドの製造方法であり、医薬品素材、機能性食品として有用なジペプチドをより安価に提供することを可能とするものである。

以下、本発明のジペプチドの製造方法を、

[I] L-アミノ酸アミドとL-アミノ酸とからジペプチドを生成する能力を有する微生物

[II] L-アミノ酸アミドハイドロラーゼの性質

15 [III] L-アミノ酸アミドハイドロラーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAの単離等

[IV] ジペプチドの製造方法

の順に添付の図面を参照して詳細に説明する。

[I] L-アミノ酸アミドとL-アミノ酸とからジペプチドを生成する能力を有する微生物

本発明に使用する微生物としては、L-アミノ酸アミドとL-アミノ酸とから

ジペプチドを生成する能力を有する微生物を特に限定なく使用することができる。L-アミノ酸アミドとL-アミノ酸とからジペプチドを生成する能力を有する微生物としてはバチルス属、コリネバクテリウム属、エルビニア属、ロドコッカス属、クリセオバクテリウム属、ミクロコッカス属、シュードモナス属、クリプトコッカス属、トリコスポロン属、ロドスボリジウム属、スポロプロマイセス属、トレメラ属、トルラスピラ属、ステリグマトイセス属、ロドトルラ属に属する微生物を挙げることができるが、具体的には以下のものを例示することができる。

	バチルス・メガテリウム AJ 3284	FERM BP-8090
10	(<i>Bacillus megaterium</i>)	
	コリネバクテリウム・グルタミカム	ATCC 13286
	(<i>Corynebacterium glutamicum</i>)	
	エルビニア・カロトボーラ AJ 2719	FERM BP-8089
	(<i>Erwinia carotovora</i>)	
15	ロドコッカス・ロドクロス	ATCC 19149
	(<i>Rhodococcus rhodochrous</i>)	
	クリセオバクテリウム・メニンゴセプチカム	ATCC 13253
	(<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>)	
	ミクロコッカス・ルテウス	ATCC 9341
20	(<i>Micrococcus luteus</i>)	
	シュードモナス・サッカロフィラ	ATCC 15946
	(<i>Pseudomonas saccharophila</i>)	
	クリプトコッカス・アルビドウス	IFO 0378
	(<i>Cryptococcus albidus var. albidus</i>)	
25	トリコスポロン・グラシル	ATCC 24660
	(<i>Trichosporon gracile</i>)	
	ロドスボリジウム・ジオボヴァツム	ATCC 22264

	(<i>Rhodosporidium diobovatum</i>)	
	スピロプロマイセス・サーモニカラ一	I F O 1 0 3 8
	(<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>)	
	トレメラ・フォリアセア	I F O 9 2 9 7
5	(<i>Tremela foliacea</i>)	
	トルラスピラ・デルブレッキイ	I F O 1 0 8 3
	(<i>Torulaspora delbrueckii</i>)	
	ステリグマトマイセス・エルヴィニアエ	I F O 1 8 4 3
	(<i>Sterigmatomyces elviae</i>)	
10	ロドトルラ・インゲニオサ	A T C C 2 2 9 9 3
	(<i>Rhodotorula ingens</i>)	

上記微生物の寄託機関は次のとおりである。

独立行政法人産業技術総合研究所特許微生物寄託センター (International Patent Organism Depository National Institute of Advanced Industrial Science and Technology、日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6)
 財団法人発酵研究所 (Institute For Fermentation, Osaka (IFO) 、日本国大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号)
 American Type Culture Collection (P.O. BOX 1549 Manassas, VA USA)
 なお、バチルス・メガテリウム AJ3284株は、2001年7月13日に
 20 独立行政法人産業技術総合研究所特許微生物寄託センターに寄託され、受託番号 FERM-P18421が付与され、さらに平成14年6月25日に、独立行政
 法人産業技術総合研究所特許寄託センター (日本国茨城県つくば市東1丁目1番
 地1 中央第6) に、ブダペスト条約に基づく寄託へ移管され、FERM-BP
 -8090が付与された微生物である。また、エルビニア・カロトボーラ AJ
 25 2719株は、2001年7月13日に独立行政法人産業技術総合研究所特許微
 生物寄託センターに寄託され、受託番号 FERM-P18420が付与され、さ
 らに平成14年6月25日に、独立行政法人産業技術総合研究所特許寄託センタ

一（日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6）に、ブダペスト条約に基づく寄託へ移管され、FERM BP-8089が付与された微生物である。

これらの微生物としては、野生株または変異株のいずれを用いてもよいし、また、細胞融合もしくは遺伝子操作などの遺伝学的手法により誘導される組み換え株等も用いることができる。

このような微生物の菌体を得るには、当該微生物を適当な培地で培養増殖せしめるとよい。このための培地はその微生物が増殖し得るものであれば特に制限はなく、通常の炭素源、窒素源、無機イオン、更に必要に応じ有機栄養源を含む通常の培地でよい。

10 例えは、炭素源としては上記微生物が利用可能であればいずれも使用でき、具体的には、グルコース、フラクトース、マルトース、アミロース等の糖類、ソルビトール、エタノール、グリセロール等のアルコール類、フマル酸、クエン酸、酢酸、プロピオン酸などの有機酸類及びこれらの塩類、パラフィンなどの炭水化合物類あるいはこれらの混合物などを使用することができる。

15 窒素源としては、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウムなどの無機塩のアンモニウム塩、フマル酸アンモニウム、クエン酸アンモニウムなどの有機酸のアンモニウム塩、硝酸ナトリウム、硝酸カリウムなどの硝酸塩、ペプトン、酵母エキス、肉エキス、コーンスティーブリカーなどの有機窒素化合物あるいはこれらの混合物を使用することができる。

20 他に無機塩類、微量金属塩、ビタミン類等、通常の培地に用いられる栄養源を適宜混合して用いることができる。

培地には、更にL-アミノ酸アミドを添加することにより、L-アミノ酸アミドとL-アミノ酸とからジペプチドを生成する活性の高い菌体が得られる場合がある。

25 培養条件にも格別の制限はなく、例えば、好気的条件下にてpH 5～8、温度20～40℃の範囲でpHおよび温度を適当に制限しつつ12～48時間程度培養を行えばよい。

[II] L-アミノ酸アミドハイドロラーゼの性質

つぎに、上記微生物のうち、コリネバクテリウム・グルタミカムATCC13,286株を例として、L-アミノ酸アミドとL-アミノ酸とからジペプチドを生成する活性を有する酵素として精製されたL-アミノ酸アミドハイドロラーゼの性質について説明する。

当該L-アミノ酸アミドハイドロラーゼは、L-アミノ酸アミドを加水分解し、L-アミノ酸を生成する活性、および、L-アミノ酸アミドとL-アミノ酸とを基質としてジペプチドを生成する活性を有するものである。L-アラニンアミドとL-グルタミンとを原料（基質）とする場合を例に取ると、L-アミノ酸アミドハイドロラーゼは、少なくともL-アラニンアミドを加水分解しL-アラニンを生成する活性、L-アラニンアミドとL-グルタミンとを基質としL-アラニル-L-グルタミンを生成する活性を有する。また、L-アラニンアミドとL-アスパラギンとを原料とする場合を例に取ると、L-アミノ酸アミドハイドロラーゼは、少なくともL-アラニンアミドを加水分解しL-アラニンを生成する活性、L-アラニンアミドとL-アスパラギンとを基質としL-アラニル-L-アスパラギンを生成する活性を有する。

作用としては、L-アラニンアミドと、L-グルタミンまたはL-アスパラギンを原料とする場合を例に取ると、L-アミノ酸アミドハイドロラーゼは、L-アラニンアミド1分子を加水分解して、L-アラニン1分子とアンモニア1分子を生成、L-アラニンアミド1分子とL-グルタミン1分子とアンモニア1分子を生成、L-アラニンアミド1分子とL-アスパラギン1分子からL-アラニル-L-アスパラギン1分子とアンモニア1分子を生成する。

至適pHは6.0から10.0付近にあり、至適温度は30から50°C付近にある。サブユニットの分子量はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によつて42,000～46,000と算出される。

[III] L-アミノ酸アミドハイドロラーゼ活性を有するタンパク質をコードす

るDNAの単離等。

本発明で用いられる、L-アミノ酸アミドとL-アミノ酸とからジペプチドを生成する反応を触媒する酵素または酵素含有物は、当該酵素を有する上記の微生物群から遺伝子工学的な手法を用いて、当該酵素をコードするDNA単離し、形質転換体を作製することによっても得ることができる。

一例として、コリネバクテリウム グルタミカムから単離されたL-アミノ酸アミドハイドロラーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA [III-1] およびこれを導入した形質転換体 [III-2] について説明する。

[III-1] DNAの単離

はじめに、精製されたL-アミノ酸アミドハイドロラーゼのアミノ酸配列を決定する。エドマン法 (Edman, P., *Acta Chem. Scand.* 4, 227 (1950)) を用いてアミノ酸配列を決定することができる。またApplied Biosystems社製のシーケンサーを用いてアミノ酸配列を決定することができる。精製されたL-アミノ酸アミドハイドロラーゼについて、N末端、あるいは、リジルエンドペプチダーゼ等の処理により得られたペプチドの約10から30残基のアミノ酸配列を決定し、明らかとなったアミノ酸配列に基づいて、これをコードするDNAの塩基配列を演繹できる。DNAの塩基配列を演繹するには、ユニバーサルコドンを採用する。

演繹された塩基配列に基づいて、30塩基対程度のDNA分子を合成する。該DNA分子を合成する方法はTetrahedron Letters, 22, 1859 (1981)に開示されている。また、Applied Biosystems社製のシンセサイザーを用いて該DNA分子を合成できる。該DNA分子をプライマーとして用いて、PCR法で染色体DNAからL-アミノ酸アミドハイドロラーゼをコードするDNAを増幅することができる。ただし、PCR法を用いて増幅されるDNAは、L-アミノ酸アミドハイドロラーゼをコードするDNA全長を含んでいないので、PCR法を用いて増幅されるDNAをプローブとして用いて、L-アミノ酸アミドハイドロラーゼをコードするDNA全長を遺伝子ライブラリーから単離する。

あるいは、遺伝子の塩基配列の一部が既知である場合には、その既知配列を有するDNAをプローブとして用いて、ペプチド生成酵素をコードするDNA全長を染色体遺伝子ライブラリーから単離することができる。

さらに、遺伝子の塩基配列が既知配列と相同性を有する場合には、その既知配列を有するDNAをプローブとして用いて、ペプチド生成酵素をコードするDNA全長を染色体遺伝子ライブラリーから単離することができる。
5

PCR法の操作については、White, T. J. et al., Trends Genet. 5, 185 (1989)等に記載されている。染色体DNAを調製する方法、さらにDNA分子をプローブとして用いて、遺伝子ライブラリーから目的とするDNA分子を単離する方法については、Molecular Cloning, 2nd edition, Cold Spring Harbor press (1989)等に記載されている。
10

単離されたL-アミノ酸アミドハイドロラーゼをコードするDNAの塩基配列を決定する方法は、A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley & Sons, Inc. (1985)に記載されている。また、Applied Biosystems社製のDNAシーケンサーを用いて、塩基配列を決定することができる。このようにしてコリネバクテリウム グルタミカムATCC13286株から単離されたL-アミノ酸アミドハイドロラーゼをコードするDNAを配列表配列番号4に示す。配列表配列番号4の塩基配列のうち塩基番号57～1295からなる塩基配列がCDS (コード領域)である(本明細書において、「配列番号4に記載の塩基配列」とは、特に断らない限りCDS部分を指す)。なお、配列番号4に記載のアミノ酸アミドハイドロラーゼは、もともとアラニンアミドハイドロラーゼ活性を指標に精製された酵素に基づいて遺伝子を単離したものであるが、その基質特異性はアラニンアミドに限らず非常に幅広いためアミノ酸アミドハイドロラーゼという。
20

本発明で用い得るDNAは、配列表配列番号4で特定されるDNAのみではない。コリネバクテリウム グルタミカムATCC13286株から単離された配列表配列番号4のDNAについていえば、コリネバクテリウム グルタミカムATCC13286株の染色体DNAから単離されたL-アミノ酸アミドハイドロ

ラーゼをコードするDNAに人工的に変異を加えたDNAであっても、L-アミノ酸アミドハイドロラーゼをコードする場合には、本発明のDNAである。人工的に変異を加える方法として頻繁に用いられるものとして、Method. in Enzymol., 154 (1987)に記載されている部位特異的変異導入法がある。

5 また、配列表配列番号4に記載の塩基番号57～1295の塩基配列と相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチドとストリンジエントな条件でハイブリダイズする塩基配列を有し、L-アミノ酸アミドハイドロラーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAも本発明で用いることができるDNAである。ここで「ストリンジエントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、相同性が高いDNA同士、例えば50%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件、あるいは通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である60°C、1×SSC、0.1%SDS、このましくは、60°C、0.1×SSC、0.1%SDSに相当する塩濃度でハイブリダイズする条件があげられる。L-アミノ酸アミドハイドロラーゼの活性については既に上記にて説明したとおりである。ただし、配列表の配列番号4に記載の塩基番号57～1295の塩基配列と相補的な塩基配列とストリンジエントな条件でハイブリダイズする塩基配列の場合には、
10 50°C、pH 8の条件下で配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質の10%、好ましくは50%程度以上の酵素活性を保持していることが望ましい。

15 さらに、配列表の配列番号4に記載のDNAがコードするL-アミノ酸アミドハイドロラーゼと実質的に同一のタンパク質も本発明で用いることができる。したがって、「配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列を有し、
20 25

かつ、L-アミノ酸アミドとL-アミノ酸からジペプチドを生成する反応を触媒するL-アミノ酸アミドハイドロラーゼ活性を有するタンパク質」をコードするDNAも本発明において用いることができる。ここで「数個」とは、アミノ酸残基のタンパク質の立体構造や、L-アミノ酸アミドハイドロラーゼ活性を大きく損なわない範囲のものであり、具体的には、2～50個、好ましくは2～30個、さらに好ましくは2～10個である。また、L-アミノ酸アミドハイドロラーゼの活性については、既に説明した通りである。ただし、配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列において1または数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加または逆位を含むアミノ酸配列の場合には、50°C、pH 8の条件下で配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質の10%、好ましくは50%程度以上の酵素活性を保持していることが望ましい。

上記のように、例えばコリネバクテリウム グルタミカムATCC13286株に由来するDNAを単離した場合、本発明では下記のDNAを好適に用いることができる。

(i) 配列表の配列番号4に記載の塩基番号57～1295の塩基配列からなるDNA。

(ii) 配列表の配列番号4に記載の塩基番号57～1295の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつL-アミノ酸アミドとL-アミノ酸からジペプチドを生成する反応を触媒するL-アミノ酸アミドハイドロラーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA。

(iii) 配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNA。

(iv) 配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列を有し、かつ、L-アミノ酸アミドとL-アミノ酸からジペプチドを生成する反応を触媒するL-アミノ酸アミドハイドロラーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA。

[III-2] 形質転換体の作製

次に、L-アミノ酸アミドハイドロラーゼ活性を有するタンパク質を発現する形質転換体の作製について説明する。組み換えDNA技術を利用して酵素、生理活性物質等の有用タンパク質を製造する例は数多く知られており、組み換えDNA技術を用いることで、天然に微量に存在する有用タンパク質を大量生産できる。

本発明の方法で用いることができる形質転換体としては、例えば下記(A)、(B)または(C)などのタンパク質を発現することができる形質転換体が好適なものとして挙げられる。

(A) 配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列を有し、かつ、L-アミノ酸アミドとL-アミノ酸からジペプチドを生成する反応を触媒するL-アミノ酸アミドハイドロラーゼ活性を有するタンパク質。

(C) 配列表の配列番号4の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつL-アミノ酸アミドとL-アミノ酸からジペプチドを生成する反応を触媒するL-アミノ酸アミドハイドロラーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAでコードされるタンパク質。

上記(A)～(C)のL-アミノ酸アミドハイドロラーゼ活性を有するタンパク質を発現する形質転換体を作製するためには、上記[III-1]の欄に示した(i)～(iv)のDNAを宿主細胞に導入すればよい。すなわち、(i)、(ii)、(iii)または(iv)のDNAを宿主細胞で発現可能な発現ベクターに組み込み、これを宿主細胞に導入する。

タンパク質を組み換えDNA技術を用いて大量生産する場合、該タンパク質を生産する形質転換体内で該タンパク質が会合し、タンパク質の封入体(inclusion body)を形成させる形態も好ましい一実施形態として挙げられる。この発現生

産方法の利点は、目的のタンパク質を菌体内に存在するプロテアーゼによる消化から保護する点および目的のタンパク質を菌体破碎に続く遠心分離操作によって簡単に精製できる点等である。

このようにして得られるタンパク質封入体は、タンパク質変性剤により可溶化され、主にその変性剤を除去することによる活性再生操作を経た後、正しく折り畳まれた生理的に活性なタンパク質に変換される。例えば、ヒトインターロイキン-2の活性再生（特開昭61-257931号公報）等多くの例がある。

タンパク質封入体から活性型タンパク質を得るためにには、可溶化・活性再生等の一連の操作が必要であり、直接活性型タンパク質を生産する場合よりも操作が複雑になる。しかし、菌体の生育に影響を及ぼすようなタンパク質を菌体内で大量に生産させる場合は、不活性なタンパク質封入体として菌体内に蓄積させることにより、その影響を抑えることができる。

目的タンパク質を封入体として大量生産させる方法として、強力なプロモータの制御下、目的のタンパク質を単独で発現させる方法の他、大量発現することが知られているタンパク質との融合タンパク質として発現させる方法がある。

さらに、融合タンパク質として発現させた後に、目的のタンパク質を切り出すため、制限プロテアーゼの認識配列を適当な位置に配しておくことも有効である。

タンパク質を組み換えDNA技術を用いて大量生産する場合、形質転換される宿主細胞としては、細菌細胞、放線菌細胞、酵母細胞、カビ細胞、植物細胞、動物細胞等を用いることができるが、一般に大腸菌などの腸内細菌、好ましくはエシェリヒアコリが用いられる。大腸菌を用いてタンパクを大量生産する技術について数多くの知見があるためである。以下、形質転換された大腸菌を用いてL-アミノ酸アミドハイドロラーゼを製造する方法の一形態を説明する。

L-アミノ酸アミドハイドロラーゼをコードするDNAを発現させるプロモータとしては、通常大腸菌における異種タンパク質生産に用いられるプロモータを使用することができ、例えば、T7プロモータ、trpプロモータ、lacプロ

モータ、*t r c*プロモータ、*t a c*プロモータ、ラムダファージの*P_R*プロモータ、*P_L*プロモータ等の強力なプロモータが挙げられる。

L-アミノ酸アミドハイドロラーゼを融合タンパク質封入体として生産させるためには、L-アミノ酸アミドハイドロラーゼ遺伝子の上流あるいは下流に、他のタンパク質、好ましくは親水性であるペプチドをコードする遺伝子を連結して、融合タンパク質遺伝子とする。このような他のタンパク質をコードする遺伝子としては、融合タンパク質の蓄積量を増加させ、変性・再生工程後に融合タンパク質の溶解性を高めるものであればよく、例えば、T7 gene 10、β-ガラクトシダーゼ遺伝子、デヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、インターフェロンγ遺伝子、インターロイキン-2遺伝子、プロキモシン遺伝子等が候補として挙げられる。

これらの遺伝子とL-アミノ酸アミドハイドロラーゼをコードする遺伝子とを連結する際には、コドンの読み取りフレームが一致するようにする。適当な制限酵素部位で連結するか、あるいは適当な配列の合成DNAを利用すればよい。

また、生産量を増大させるためには、融合タンパク質遺伝子の下流に転写終結配列であるターミネーターを連結することが好ましい場合がある。このターミネータとしては、T7ターミネータ、fdファージターミネータ、T4ターミネータ、テトラサイクリン耐性遺伝子のターミネータ、大腸菌*t r p A*遺伝子のターミネータ等が挙げられる。

L-アミノ酸アミドハイドロラーゼまたはL-アミノ酸アミドハイドロラーゼと他のタンパク質との融合タンパク質をコードする遺伝子を大腸菌に導入するためのベクターとしては、いわゆるマルチコピー型のものが好ましく、C_OI E 1由来の複製開始点を有するプラスミド、例えばpUC系のプラスミドやpBR322系のプラスミドあるいはその誘導体が挙げられる。ここで、「誘導体」とは、塩基の置換、欠失、挿入、付加または逆位などによってプラスミドに改変を施したものと意味する。なお、ここでいう改変とは、変異剤やUV照射などによる変異処理、あるいは自然変異などによる改変をも含む。より具体的には、ベクタ

一としては、例えば、pUC19、pUC18、pBR322、pHSG299、pHSG298、pHSG399、pHSG398、RSF1010、pMW119、pMW118、pMW219、pMW218等を用いることができる。他にもファージDNAのベクターも利用できる。

- 5 また、形質転換体を選別するために、該ベクターがアンピシリン耐性遺伝子等のマーカーを有することが好ましい。このようなプラスミドとして、強力なプロモーターを持つ発現ベクターが市販されている（pUC系（宝酒造（株）製）、pPROK系（クローンテック製）、pKK233-2（クローンテック製）ほか）。
- 10 プロモータ、L-アミノ酸アミドハイドロラーゼまたはL-アミノ酸アミドハイドロラーゼと他のタンパク質との融合タンパク質をコードする遺伝子、および場合によってはターミネータの順に連結したDNA断片と、ベクターDNAとを連結して組み換えDNAを得る。

該組み換えDNAを用いて大腸菌を形質転換し、この大腸菌を培養すると、L-アミノ酸アミドハイドロラーゼまたはL-アミノ酸アミドハイドロラーゼと他のタンパク質との融合タンパク質が発現生産される。形質転換される宿主は、異種遺伝子の発現に通常用いられる株を使用することができるが、例えばエシエリヒアコリJM109株が好ましい。形質転換を行う方法、および形質転換体を選別する方法はMolecular Cloning, 2nd edition, Cold Spring Harbor press (1989)等に記載されている。

融合タンパク質として発現させた場合、血液凝固因子Xa、カリクレインなどの、L-アミノ酸アミドハイドロラーゼ内に存在しない配列を認識配列とする制限プロテアーゼを用いてL-アミノ酸アミドハイドロラーゼを切り出せるようにしてもよい。

25 生産培地としては、M9-カザミノ酸培地、LB培地など、大腸菌を培養するために通常用いる培地を用いてもよい。また、培養条件、生産誘導条件は、用いたベクターのマーカー、プロモータ、宿主菌等の種類に応じて適宜選択する。

L-アミノ酸アミドハイドロラーゼまたはL-アミノ酸アミドハイドロラーゼと他のタンパク質との融合タンパク質を回収するには、以下の方法などがある。

L-アミノ酸アミドハイドロラーゼあるいはその融合タンパク質が菌体内に可溶化されれば、菌体を回収した後、菌体を破碎あるいは溶菌させ、粗酵素液として使用できる。さらに、必要に応じて、通常の沈殿、濾過、カラムクロマトグラフィー等の手法によりL-アミノ酸アミドハイドロラーゼあるいはその融合タンパク質を精製して用いることも可能である。この場合、L-アミノ酸アミドハイドロラーゼあるいは融合タンパク質の抗体を利用した精製法も利用できる。

タンパク質封入体が形成される場合には、変性剤でこれを可溶化する。菌体タンパク質とともに可溶化してもよいが、以降の精製操作を考慮すると、封入体を取り出して、これを可溶化するのが好ましい。封入体を菌体から回収するには、従来公知の方法で行えばよい。例えば、菌体を破壊し、遠心分離操作等によって封入体を回収する。タンパク質封入体を可溶化させる変性剤としては、グアニジン塩酸（例えば、6M、pH 5～8）や尿素（例えば8M）などが挙げられる。

これらの変性剤を透析等により除くと、活性を有するタンパク質として再生される。透析に用いる透析溶液としては、トリス塩酸緩衝液やリン酸緩衝液などを用いればよく、濃度としては20 mM～0.5 M、pHとしては5～8が挙げられる。

再生工程時のタンパク質濃度は、500 μg/ml程度以下に抑えるのが好ましい。再生したL-アミノ酸アミドハイドロラーゼが自己架橋を行うのを抑るために、透析温度は5°C以下であることが好ましい。また、変性剤除去の方法として、この透析法のほか、希釈法、限外濾過法などがあり、いずれを用いても活性の再生が期待できる。

L-アミノ酸アミドハイドロラーゼをコードするDNAとして、配列表配列番号4に示されるDNAを用いた場合には配列番号5に記載のアミノ酸配列を有するL-アミノ酸アミドハイドロラーゼが生産される。

なお、遺伝子工学的な手法については、例えばMolecular Cloning, 2nd editi

on, Cold Spring Harbor press (1989)などの文献に記載された手法に準拠して実施することができる。

[IV] ジペプチドの製造方法

本発明のジペプチドの製造方法は、L-アミノ酸アミドとL-アミノ酸とからジペプチドを生成する能力を有する酵素または酵素含有物、より具体的には、微生物の培養物、該培養物より分離した微生物菌体、または、該微生物の菌体処理物を用いて、L-アミノ酸アミドおよびL-アミノ酸からジペプチドを製造するものである。

上記L-アミノ酸アミドハイドロラーゼは、L-アミノ酸アミドを加水分解してL-アミノ酸を生成する活性を有するとともに、L-アミノ酸アミドとL-アミノ酸を基質としてジペプチドを生成する活性を有するものである。

第1図は、本発明のジペプチドの製造方法のフローチャートである。

先ず、L-アミノ酸アミドとL-アミノ酸とからジペプチドを生成する能力を有する微生物を培地中で培養し、培地中および/または細胞中にL-アミノ酸アミドハイドロラーゼを生成蓄積させる(ステップS1)。

次に、L-アミノ酸アミドハイドロラーゼを回収・精製することによって精製L-アミノ酸アミドハイドロラーゼを製造する(ステップS2)。

続いて、ステップS2で生産した精製L-アミノ酸アミドハイドロラーゼまたはステップS1で蓄積したL-アミノ酸アミドハイドロラーゼにL-アミノ酸アミドおよびL-アミノ酸を添加して反応を進行させることでジペプチドを大量に製造することができる(ステップS3)。

上記微生物の產生するL-アミノ酸アミドハイドロラーゼをL-アミノ酸アミドおよびL-アミノ酸に作用せしめる方法としては、上記微生物を培養しながら、培養液中に直接基質を添加してもよいし、微生物培養物から遠心分離等により菌体を分離し、これをそのままもしくは洗浄した後、緩衝液に再懸濁したものにL-アミノ酸アミドおよびL-アミノ酸を添加して反応させてよい。あるいは、ポリアクリルアミドゲル法、カラギーナン法、アルギン酸ゲル法等の公知の方

法で固定化した菌体を用いることができる。

また、微生物菌体の処理物として、菌体破碎物、アセトン処理菌体、凍結乾燥菌体を用いてもよい。菌体破碎には超音波破碎、フレンチプレス破碎、ガラスピーズ破碎等の方法を用いることができ、また溶菌させる場合には卵白リゾチーム
5 や、ペプチダーゼ処理、またはこれらを適宜組み合わせた方法が用いられる。

さらに、当該微生物菌体処理物からL-アミノ酸アミドハイドロラーゼを回収し、粗酵素液として使用してもよいし、必要に応じて、酵素を精製して用いてもよい。培養物からの精製法としては通常の酵素精製法をもちいることができる。具体的には遠心分離等によって菌体を集め、超音波処理、ガラスピーズ、ダイノ
10 ミルなどの機械的方法によって菌体を破碎し、細胞片等の固形物を遠心分離によって除き、粗酵素を得て、超遠心分離分画、塩析、有機溶媒沈殿、イオン交換クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー等を行うことによって上述のL-アラニンアミドハイドロラーゼが精製される。

すなわち、L-アミノ酸アミドとL-アミノ酸とからジペプチドを生成する活性を有する画分であれば、酵素と当該酵素含有物全てを使用することが可能である。ここで「酵素含有物」とは、当該酵素を含むものであればよく、具体的な形態としては、当該酵素を生産する微生物の培養物、当該培養物から分離された微生物菌体、菌体処理物などが含まれる。微生物の培養物とは、微生物を培養して得られる物のことであり、より具体的には、微生物菌体、その微生物の培養に用いた培地および培養された微生物により生成された物質の混合物などをいう。また、微生物菌体は洗浄し、洗浄菌体として用いてもよいし、これらを共有結合法、吸着法、包括法等によって固定化した固定化物を使用してもよい。また、使用する微生物によっては、培養中に一部、溶菌するものもあるので、この場合には培養液上清も酵素含有物として利用できる。

酵素または酵素含有物の使用量は、目的とする効果を発揮する量（有効量）であればよく、この有効量は当業者であれば簡単な予備実験により容易に求められ

るが、例えば洗浄菌体を用いる場合は反応液 1 リットル当たり 1 ~ 500 g である。

L-アミノ酸アミドとしては、当該 L-アミノ酸アミドハイドロラーゼの基質特異性において加水分解できる L-アミノ酸アミドであればいかなるものも使用でき、例えば、天然型のアミノ酸に対応した L-アミノ酸アミドだけでなく、非天然型のアミノ酸若しくはその誘導体に対応する L-アミノ酸アミドをも使用可能である。また、本発明で用いる L-アミノ酸アミドハイドロラーゼは、ラセミ体のアミノ酸アミドを不斉加水分解して L-アミノ酸を与えるため、ストレッカ法で安価に合成可能なラセミ体のアミノ酸アミドを用いることもできる。本発明においては、L-アミノ酸アミドとして好ましいものを例示すると、L-アラニンアミド、グリシンアミドおよび L-アスパラギン酸アミドなどが挙げられ、特に好ましくは、L-アラニンアミドなどが挙げられる。

L-アミノ酸としては、当該 L-アミノ酸アミドハイドロラーゼの基質特異性において L-アミノ酸アミドとジペプチドを形成するものであれば特に限定なく公知のものを使用できる。L-アミノ酸として好ましいものを例示すると、L-グルタミン、L-アスパラギン、グリシン、L-アラニン、L-バリン、L-ロイシン、L-イソロイシン、L-メチオニン、L-プロリン、L-フェニルアラニン、L-トリプトファン、L-セリン、L-スレオニン、L-チロシン、L-リジン、L-アルギニン、L-ヒスチジンおよび L-グルタミン酸などが挙げられ、特に好ましくは L-グルタミンまたは L-アスパラギンなどが挙げられる。

上記 L-アミノ酸アミド、L-アミノ酸は、それぞれ 1 種を選択してジペプチドを生成させてもよいし、また 2 種以上を選択してジペプチドを生成させてもよい。

出発原料である L-アミノ酸アミドおよび L-アミノ酸の濃度は各々 1 mM ~ 10 M、好ましくは 0.1 M ~ 2 M であるが、L-アミノ酸アミドに対して L-アミノ酸を等量以上添加したほうが好ましい場合がある。また、必要ならば、例えば基質が高濃度だと反応を阻害するような場合には、反応の間、これらを阻害

しない濃度にして逐次添加する事ができる。

- 反応温度は10～70℃、好ましくは20～50℃であり、反応pHはpH2～12好ましくはpH3～11である。かくして2～48時間程度反応を行うことにより、反応混合物中にジペプチドが生成蓄積する。ジペプチド生成反応は平衡反応であるため、効率的生産を図るために生成するジペプチド、アンモニアを分離し、反応をさらに進行させてもよい。

実施例

以下実施例をあげて、さらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。なお、実施例におけるL-アラニン、L-アラニル-L-グルタミンまたはL-アラニル-L-アスパラギンの定量は高速液体クロマトグラフィーを用いる方法（カラム：GLサイエンス社製 Inertsil ODS-2、溶離液：リン酸水溶液（pH2.1）、2.5mM 1-オクタンスルホン酸ナトリウム/メタノール=10/1、流量：1.0mL/min、検出210nm）により行った。

（実施例1） L-アラニル-L-アスパラギンの製造

酵母エキス0.5%（w/v）、ペプトン0.5%（w/v）、グリセロール0.5%（w/v）、塩化ナトリウム0.5%（w/v）、L-アラニンアミド塩酸塩0.5%（w/v）（pH7.0）の培地50mLを500mL坂口フラスコに分注し、120℃で20分殺菌した。これに酵母エキス0.5%（w/v）、ペプトン0.5%（w/v）、グリセロール0.5%（w/v）、塩化ナトリウム0.5%（w/v）、L-アラニンアミド塩酸塩0.5%（w/v）、寒天2%（w/v）（pH7.0）を含む斜面培地で30℃、24時間培養した表1に示した微生物の菌体を1白金耳接種し、30℃、120往復/分、で20時間振とう培養を行った。培養後、菌体を遠心分離し、培養液と等量の生理食塩水にて2回洗浄し、再び遠心分離して菌体を集め、0.2Mトリス塩酸緩衝液（pH9.0）にて懸濁し10mLとした。菌体懸濁液1mLをL-アラニンアミド塩酸塩6.2.5mM

、及びL-アスパラギン250mMを含む上記緩衝液4mLに添加し、全量を5mLとした後、30℃にて24時間反応をおこなった。対照実験として菌体無添加区を設定した。結果を表1に示した。

表 1

微生物	生成 L-Ala-L-Asn(mM)
バチルス・メガテリウム FERM BP-8090	0. 4
コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC13286	1. 8
エルビニア・カロトボーラ FERM BP-8089	0. 5
ロドコッカス・ロドクロス ATCC19149	1. 0
クリセオバクテリウム・メニンゴセプチカム ATCC13253	0. 1
ミクロコッカス・ルテウス ATCC9341	0. 1
シュードモナス・サッカロフィラ ATCC9114	0. 1
クリプトコッカス・アルビドウス IFO610	1. 8
トリコスプロロン・グラシル ATCC24660	2. 5
ロドスピリジウム・ジオボヴァツム ATCC22264	2. 7
スプロプロマイセス・サーモニカラ IFO1038	1. 5
トレメラ・フォリアセア IFO9297	3. 3
トルラスピラ・デルブレッキイ IFO1083	2. 9
ステリグマトイセス・エルヴィニアエ IFO1843	0. 1
ロドルラ・インゲニオサ ATCC22993	0. 1
菌体無添加	検出限界以下

L-Ala-L-Asn:L-アラニル-L-アスパラギン

(実施例2) コリネバクテリウム・グルタミカムATCC13286株からのL-アラニンアミドハイドロラーゼの精製

酵素の力価の測定は以下のように行った。トリス塩酸緩衝液(pH9.0)200μmol、L-アラニンアミド塩酸塩50μmolおよび適当量の酵素液を5加え、全量が1mlとなるように混合し、30℃にて、60分間反応させた後、リン酸水溶液(pH2.1)を4ml加え反応を停止した。生成したL-アラニンは高速液体クロマトグラフィーにより定量した。1分間に1μmolのL-アラニンを生成する酵素量を1単位とした。

実施例1と同様にして、コリネバクテリウム・グルタミカムATCC13286株を8L培養し、遠心分離により菌体を集めた。以下の操作は氷上あるいは4℃にて行った。菌体を50mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.0)にて洗浄後、0.1mm径のガラスピーブルをもちいて約10分間破碎処理を行った。ガラスピーブルと菌体破碎液を分離し、20,000×g、30分の遠心分離にて破碎菌体片を除去し、無細胞抽出液を得た。更に200,000×g、60分の超遠心分離にて不溶性画分を除去し、上清液として可溶性画分を得た。得られた可溶性画分に硫酸アンモニウムを60%飽和になるように添加し、20,000×g、30分の遠心分離によって沈殿を回収した。得られた沈殿を少量の50mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.0)に溶解し、50mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.0)に対して透析した。この酵素液を50mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.0)で予め平衡化したQ-Sepharose HPカラムに供し、0~1.0M塩化ナトリウムを含む50mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.0)の直線的な濃度勾配で酵素を溶出させた。活性画分を集め、50mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.0)で予め平衡化したSuperdex 200 pgカラムに供し、同緩衝液で酵素を溶出させた。活性画分を集め、0.5M硫酸アンモニウムを含む20mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.0)に対して透析を行い、0.5M硫酸アンモニウムを含む20mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.0)で予め平衡化したPhenyl-Sepharose HPカラムに供した。0.5~0M硫酸アンモニウムを含む20mMリン

酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) の直線的な濃度勾配で酵素を溶出させた。活性画分を集め、50 mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) に対して透析し、これを50 mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) で予め平衡化したMonoQカラムに供し、0~1.0 M塩化ナトリウムを含む50 mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) の直線的な濃度勾配で酵素を溶出させた。こうしてL-アラニンアミドハイドロラーゼを電気泳動的に均一に精製した。各精製過程における総タンパク量および比活性を表2に示す。

表2

工程	総活性 (単位)	総タンパク (mg)	比活性 (単位/mg)
無細胞抽出液	80	2000	0.040
可溶性画分	71	1690	0.042
硫酸アンモニウム分画	79	1080	0.073
Q-Sepharose HP	56	379	0.149
Superdex200pg	21	151	0.135
Phenyl-Sepharose HP	12.5	6.60	1.897
MonoQ	2.4	0.24	9.841

10

(実施例3) L-アラニンハイドロラーゼの分子量の評価

実施例2の方法により得られた精製酵素標品0.5 μg相当をポリアクリルアミド電気泳動に供した。電気泳動緩衝液には0.3% (w/v) トリス、1.4% (w/v) グリシン、0.1% (w/v) ラウリル硫酸ナトリウムを、ポリアクリルアミドゲルはゲル濃度10~20%の濃度勾配ゲル (マルチゲル10~20、第一化学薬品製)、分子量マーカーはバイオラッド製プレシジョンプレステインドスタンダードをもちいた。電気泳動終了後、クーマシープリリアントブルーR-250によってゲルを染色し、分子量42,000~46,000と算

出される位置に均一なバンドが検出された。

(実施例4) L-アラニンアミドハイドロラーゼ至適pHの評価

実施例2で均一に精製されたL-アラニンアミドハイドロラーゼをもちいて、
L-アラニンアミドを加水分解し、L-アラニンを生成する反応について反応p
5 Hの評価を以下のように行った。緩衝液として、酢酸ナトリウム緩衝液(pH3
. 0~6. 0)、リン酸カリウム緩衝液(pH6. 0~8. 0)、トリス塩酸緩衝
液(pH7. 0~9. 0)、炭酸ナトリウム緩衝液(pH8. 0~10. 0)、
および、グリシン-水酸化ナトリウム緩衝液を200 μmol、L-アラニンア
ミド塩酸塩50 μmolおよび適当量の酵素液を加え、全量が1mlとなるよう
10 に混合し、30℃にて、60分間反応させ酵素活性を評価した。トリス塩酸緩衝
液(pH8. 0)をもちいた場合の活性を100%とした結果を第2図に示した
。

(実施例5) L-アラニンアミドハイドロラーゼ反応温度の評価

実施例2で均一に精製されたL-アラニンアミドハイドロラーゼをもちいて、
15 L-アラニンアミドを加水分解し、L-アラニンを生成する反応について反応温
度の評価を以下のように行った。トリス塩酸緩衝液を200 μmol、L-アラ
ニンアミド塩酸塩50 μmol、および適当量の酵素液を加え、全量が1mlと
なるように混合し、25、30、40、50、60℃にて、60分間反応させ酵
素活性を評価した。反応温度40℃の場合の活性を100%とした結果を第3図
20 に示した。

(実施例6) L-アラニル-L-アスパラギン、L-アラニル-L-グルタ
ミンの製造

実施例2で均一に精製されたL-アラニンアミドハイドロラーゼを、L-アラ
ニンアミド塩酸塩とL-アスパラギン、もしくは、L-アラニンアミド塩酸塩と
25 L-グルタミンに作用させL-アラニル-L-アスパラギン、もしくは、L-ア
ラニル-L-グルタミンを生成せしめた。L-アラニル-L-アスパラギンを得
る場合はトリス塩酸緩衝液(pH9. 0)200 μmol、L-アラニンアミド

塩酸塩 $50\mu\text{mol}$ 、L-アスパラギン $150\mu\text{mol}$ およびL-アラニンアミドハイドロラーゼ活性 0.08 単位の酵素液を加え、全量が 1mL となるように混合した。L-アラニル-L-グルタミンを得る場合は、L-アスパラギン $150\mu\text{mol}$ のかわりにL-グルタミン $150\mu\text{mol}$ をもちいる以外はL-アラニル-L-アスパラギンを得る場合と同条件にて混合した。対照実験として基質のいずれか一方のみを用いるか、酵素無添加区を設定した。反応温度 30°C 、10時間反応し、目的生成物を定量した結果を表3に示した。

表3

基質	酵素添加	生成物	生成物濃度(mM)	
L-アラニンアミド	L-アスパラギン	あり	L-アラニル-L-アスパラギン	8.4
L-アラニンアミド	-	あり	L-アラニル-L-アスパラギン	検出限界以下
-	L-アスパラギン	あり	L-アラニル-L-アスパラギン	検出限界以下
L-アラニンアミド	L-アスパラギン	なし	L-アラニル-L-アスパラギン	検出限界以下
L-アラニンアミド	L-グルタミン	あり	L-アラニル-L-グルタミン	7.7
L-アラニンアミド	-	あり	L-アラニル-L-グルタミン	検出限界以下
-	L-グルタミン	あり	L-アラニル-L-グルタミン	検出限界以下
L-アラニンアミド	L-グルタミン	なし	L-アラニル-L-グルタミン	検出限界以下

10

(実施例7) L-アラニンアミドハイドロラーゼ遺伝子の単離

以下、L-アラニンアミドハイドロラーゼ遺伝子の単離と*E. coli* (*Escherichia coli*)でのL-アラニンアミドハイドロラーゼの発現について述べるが、菌株は、コリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 13286 株を用いた。遺伝子の単離、L-アラニンアミドハイドロラーゼの発現とも、*E. coli* JM109を宿主に用い、ベクターはpUC18を用いた。

1. 決定アミノ酸配列に基づいたPCRプライマーの作製

前述のコリネバクテリウム グルタミカム ATCC 13286 株由来のL-アラニンアミドハイドロラーゼのN末端アミノ酸配列（配列表配列番号1）をもとに、配列表配列番号2、3にそれぞれ示すミックスプライマーを作製した。

2. 菌体の取得

コリネバクテリウム グルタミカムATCC13286株をCM2G1y寒天培地(0.5g/dl グリセロール、1.0g/dl 酵母エキス、1.0g/dl ペプトン、0.5g/dl NaCl、2g/dl 寒天、pH7.

5 0)上で30°C、24時間培養し菌をリフレッシュした。これを50mlのCM2G1y液体培地を張り込んだ500mlの坂口フラスコに1白金耳植菌し、30°C、16時間好気的に振盪培養した。

3. 菌体からの染色体DNAの取得

培養液50mlを遠心分離操作(12,000rpm、4°C、15分間)に供し、集菌した。この菌体を10mlの20mM EDTAを含む50mMトリス塩酸緩衝液(pH8.0)に懸濁し、遠心分離操作により菌体を回収した。再び、この菌体を10mlの20mM EDTAを含む50mMトリス塩酸緩衝液(pH8.0)に懸濁した。さらに、この懸濁液に、0.5mlの20mg/mlリゾチーム溶液、1mlの10%SDS(ドデシル硫酸ナトリウム)溶液を加えた後15、55°Cで20分間インキュベートした。このインキュベートした溶液に、1mM EDTAを含む10mMトリス塩酸緩衝液(pH8.0)で飽和したフェノールを等量加えて除タンパクを行った。この分離した水層に対して、等量の2-プロパノールを加えて、DNAを沈澱させ、回収した。沈澱したDNAを20mM EDTAを含む50mMトリス塩酸緩衝液(pH8.0)0.5mlに溶解した後、5μlの10mg/ml RNase、5μlの10mg/ml Proteinase Kを加えて、55°Cで2時間反応させた。反応後、この溶液に等量の1mM EDTAを含む10mMトリス塩酸緩衝液(pH8.0)で飽和したフェノールで除タンパクを行った。さらに、分離した水層に等量の24:1クロロホルム/イソアミルアルコールを加えて攪拌し、水層を回収した。この操作をさらに2回行った後に得られた水層に、終濃度0.4Mとなるように3M酢酸ナトリウム溶液(pH5.2)を加え、さらに2倍容のエタノールを加えた。沈澱となつて生じたDNAを回収し、70%エタノールで洗浄した後、乾燥させ、1mlの

1 mM EDTAを含む10 mMトリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) に溶解させた。

4. カセットPCR法によるL-アラニンアミドハイドロラーゼ遺伝子の一部を含むDNA断片の取得

5 カセットPCR法によるL-アラニンアミドハイドロラーゼをコードする遺伝子 (*aah*) を含むDNA分子の単離・増幅には、TaKaRa LA PCR in vitro Cloning Kit (宝酒造社製) を用いた。以下断わりの無い限り、説明書の方法に基づき実験を行った。カセットPCR法において、プライマー1 (1st PCR、配列番号2) と2 (2nd PCR、配列番号3) をプライマーとした場合に、*Eco RI*カセットとの間で約10 0.5 kbのバンド (フラグメント1) が増幅した。この断片の塩基配列を決定することにより、フラグメント1がの一部分であることを確認した。

5. 遺伝子ライブラリーからのL-アラニンアミドハイドロラーゼ遺伝子のクローニング

次に、*aah*の全長取得のために、フラグメント1をプローブとしてまず、サザンハイブリダイゼーションを行った。

プローブとなるDNA断片を約50 ng/ μ lに調整し、このDNA溶液16 μ lをDIG High Prime (Boehringer Mannheim) を使用して、プロトコールに準じて37°Cで24時間インキュベートしてプローブの標識を行った。

染色体DNA 1 μ gを各種制限酵素の組合せで完全消化し、0.8%アガロースゲルで電気泳動した後に、ナイロンメンブレン (Boehringer Mannheim, Nylon membranes positively charged) にプロッティングした。以下定法に従つてサザンハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションはDIG Easy Hyb (Boehringer Mannheim) を用いて行い、50°C、30分間プレハイブリダイゼーションを行った後にプローブを添加して、50°C、18時間ハイブリダイゼーションさせた。検出はDIG Nucleotide Detection Kit (Boehringer Mannheim) を用いて行った。

その結果、*Bgl* IIの切断物においては、約7 kbの位置にバンドが検出された

。この7 kb領域の断片を回収してpUC18に連結し、*E. coli* JM109にてライブラー（120株）を作製した。以下定法に従ってコロニーハイブリダイゼーションを行った。コロニーをナイロンメンブレンフィルター（Boehringer Mannheim、Nylon membranes for colony and plaque hybridization）に転写し、アルカリ変性、中和、固定化の処理を行った。ハイブリダイゼーションはDIG Easy Hybを用いて行った。フィルターをbuffer中に浸し、42°C、30分間プレハイブリダイゼーションを行った。その後、上述の標識プローブを添加し、42°C、18時間ハイブリダイゼーションを行った。SSC bufferでの洗浄後、DIG Nucleotide Detection Kitを用いてポジティブクローン1株を選抜した。

10 6. コリネバクテリウム グルタミカム ATCC13286由来L-アラニンアミドハイドロラーゼ遺伝子の塩基配列
選抜した形質転換体が保有するプラスミドをMolecular Cloning, 2nd edition, Cold Spring Harbor press (1989)に記載される方法に従って調製し、プローブとハイブリダイズした近傍の塩基配列を決定した。L-アラニンアミドハイドロラーゼの30残基のN末端アミノ酸配列を含むタンパク質をコードするオープンリーディングフレーム(ORF)が存在し、L-アラニンアミドハイドロラーゼをコードする遺伝子 *aah*であることを確認した。L-アラニンアミドハイドロラーゼ遺伝子全長の塩基配列を配列表配列番号4に示した。得られたORFはGenetyxを用いて相同性を調べたところ、既知の*Propionibacterium*属細菌由来のプロリンイミノペプチダーゼ(proline iminopeptidase)と塩基配列で57.6%の相同意性を示した。

(実施例8) L-アラニンアミドハイドロラーゼ遺伝子の*E. coli*での発現
*aah*を*E. coli*で発現させるために、pUC18のlacプロモーターの下流に*aah*を連結したプラスミドpUCAAHを構築した。コリネバクテリウム グルタミカム ATCC13286株染色体DNAを鋳型とし、表4に示すオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCRにより増幅した断片を*Sac* I、*Sma* Iで処理し、pUC18の*Sac* I、*Sma* I切断物とライゲーションした後、*E. coli* JM109を形質転換した。アンピシリン

耐性株の中から、目的のプラスミドを持った株を選択し、構築した発現プラスミドpUCAAHと命名した。

表4

5 L-アラニンアミドハイドロラーゼ発現ベクター構築に用いたプライマー

プライマー	配列
5' 側	GGCGAGCTCGGCAGTGGTGGGGGTGGTGT <i>Sac I</i> (配列番号 6)
3' 側	CGGGGGCCCTCAGCGTACCTCTCGGCCGTG <i>Sma I</i> (配列番号 7)

pUCAAHを持つ*E. coli*でのL-アラニンアミドハイドロラーゼの発現形質転換体を0.1m g / m lアンピシリンを含むLB培地で、37°C、16時間、シード培養した。LB培地50m lを張り込んだ500m l坂口フラスコに、この前培養液を1m lシードし、37°Cにて本培養を行った。培養開始2時間後に、終濃度1m Mとなるようにイソプロピル-1-チオ-β-D-ガラクトピラノシド(IPTG)を添加し、さらに3時間培養を行った。培養終了後、集菌、洗浄を行い、10m lの20m Mリン酸緩衝液(pH 8.0)に懸濁し、180W、30分間、超音波破碎した。溶液を回収し、12,000 r p mにて10分の遠心分離操作を行い、その上清を無細胞抽出液とした。

10 (実施例9) L-アラニンアミドハイドロラーゼ活性測定

培養終了後、無細胞抽出液を調製し、これを酵素源としてL-アラニンアミドハイドロラーゼ活性の測定を行った。L-アラニンアミドハイドロラーゼ活性の測定は、50m M L-アラニンアミド、150m M L-グルタミン、100m Mトリス-塩酸緩衝液(pH 9.0)、10m M EDTAおよび酵素溶液を含む反応液を30°Cで60分インキュベートした後、この反応液の4倍容のリン酸水(pH 1.5)を添加することにより反応を停止させた。HPLCにてL-アラニル-L-グルタミン量を定量することによった。酵素活性の単位として、こ

の条件にて1分間に $1 \mu\text{mol}$ のL-アラニル-L-グルタミンを生成する酵素活性をもって1ユニット(U)と定義した。

分析に用いたHPLCの条件は以下の通り。

カラム: Inertsil ODS-2

5 移動相: (リン酸水溶液(pH 2.1)), 2.5 mM sodium-l-octanesulfonate /methanol=10/1

カラム温度: 40°C

流速: 1.0 ml/分

検出: UV 210nm

10 その結果、pUC18 AAHを導入した場合に0.05 U/mgのL-アラニンアミドハイドロラーゼ活性が検出され、クローニングしたaah遺伝子がE. coliで発現したことを確認した。なお、対照としてpUC18のみを導入した場合には、活性は検出されなかった。

(実施例10) His-Tag L-アラニンアミドハイドロラーゼ遺伝子のE. coli
15 での発現

aahをE. coliで発現させるために、pUC18のlacプロモーターの下流にHis-TagタンパクとしてL-アラニンアミドハイドロラーゼを発現させるプラスミドpQEAAHを構築した。コリネバクテリウム グルタミカム ATCC13286株の染色体DNAを鑄型とし、表5に示すオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCRにより増幅した断片をSac I、Sma Iで処理し、pQE-30 (Qiagen社) のSac I、Sma I切断物とライゲーションした後、E. coli JM109を形質転換した。アンピシリン耐性株の中から、目的のプラスミドを持った株を選択し、構築した発現プラスミドpQEAAHと命名した。

表 5

His-Tag L-アラニンアミドハイドロラーゼ発現ベクター構築に用いたプライマー

プライマー	配列
5' 側	GGC <u>GAG CTC</u> ATG ACT AAA ACA CTT GGT TCC <i>Sac I</i> (配列番号 8)
3' 側	CGG <u>GGG CCC</u> TCA GCG TAC CTC TCG GCC GTG <i>Sma I</i> (配列番号 7)

5 pQEAAHを持つ*E. coli* でのL-アラニンアミドハイドロラーゼの発現形質転換体を上記と同様の方法で活性測定したところ、0.48 U/mg のL-アラニンアミドハイドロラーゼ活性を示した。

(実施例 1 1) His-Tag精製酵素の調製

10 pQEAAHを持つ*E. coli* JM109の培養液 150 ml から、上記の方法で菌体破碎し、His Trap kit (Amersham Pharmacia Biotech社製) を用い、その添付プロトコールに従ってHis-Tag L-アラニンアミドハイドロラーゼを精製した。SDS-PAGE上で単一バンドを示すタンパクが 24 mg 取得され、そのL-アラニンアミドハイドロラーゼ比活性は 13.4 U/mg であった。Ala-Glnの生成収率はL-アラニンアミドに対して7.2%であった。

15 (実施例 1 2) His-Tag精製酵素を用いた基質特異性の検討

取得したL-アラニンアミドハイドロラーゼによる実施例 6 に示したL-アラニル-L-アスパラギンおよびL-アラニル-L-グルタミン以外のペプチド合成についてHis-Tag精製酵素を用いて検討を行った。

(1) L-アラニンアミドと他のL-アミノ酸からのペプチド合成

20 合成反応は、100 mM L-アラニンアミド、150 mM 供試アミノ酸、100 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 9.0)、10 mM EDTA および酵素溶液 (0.0045 U/ml) を含む反応液を 25°C で 3 時間インキュベートし、生成したペプチドをHPLCで定量した。その結果、L-アラニル-L-アスパラギ

ンおよびL-アラニル-L-グルタミンの他にも以下の様に多くのペプチドが合成された。共試アミノ酸としてグリシンを用いた場合には、7. 54 mMのL-アラニル-グリシン、L-アラニンを用いた場合には、10. 11 mMのL-アラニル-L-アラニン、L-バリンを用いた場合には、9. 72 mMのL-アラニル-L-バリン、L-ロイシンを用いた場合には、9. 60 mMのL-アラニル-L-ロイシン、L-イソロイシンを用いた場合には、14. 11 mMのL-アラニル-L-イソロイシン、L-メチオニンを用いた場合には、14. 49 mMのL-アラニル-L-メチオニン、L-プロリンを用いた場合には、0. 81 mMのL-アラニル-L-プロリン、L-フェニルアラニンを用いた場合には、13. 42 mMのL-アラニル-L-フェニルアラニン、L-トリプトファンを用いた場合には、10. 09 mMのL-アラニル-L-トリプトファン、L-セリンを用いた場合には、24. 67 mMのL-アラニル-L-セリン、L-スレオニンを用いた場合には、20. 76 mMのL-アラニル-L-スレオニン、L-チロシンを用いた場合には、1. 52 mMのL-アラニル-L-チロシン、L-リジンを用いた場合には、18. 83 mMのL-アラニル-L-リジン、L-アルギニンを用いた場合には、27. 69 mMのL-アラニル-L-アルギニン、L-ヒスチジンを用いた場合には、12. 52 mMのL-アラニル-L-ヒスチジン、およびL-グルタミン酸を用いた場合には、1. 20 mMのL-アラニル-L-グルタミン酸が合成された。

(2) 他のL-アミノ酸アミドとL-グルタミンからのペプチド合成
20 L-アラニンアミドに代えて、グリシンアミド、L-アスパラギン酸- α -アミドを用いて、ペプチド合成を行った。
合成反応は、100 mM供試アミノ酸アミド、150 mM L-グルタミン、100 mM Tris-HCl buffer (pH 9.0)、10 mM EDTAおよび酵素 (0.0045 U/m1) を含む反応液を25°Cで3時間インキュベートし、生成したペプチドをHPLCで定量した。その結果、グリシンアミドを用いた場合には17.7 mMのグリシル-L-グルタミンが生成した。また、L-アスパラギン酸- α -アミドを用いた場合は21.2 mMの α -L-アスパラチル-L-グルタミンが

生成した。

以上のように、上記のようにして得られたL-アラニンアミドハイドロラーゼが様々な種類のL-アミノ酸アミドおよびL-アミノ酸を基質とし得ることが明らかとなった。このことから、得られた酵素はL-アラニンアミドハイドロラーゼというよりもL-アミノ酸アミドハイドロラーゼというほうが適切であることが判明した。

(配列表フリーテキスト)

- 配列番号1：コリネバクテリウム グルタミカム由来のL-アラニンアミドハイドロラーゼのN末端アミノ酸配列
10 配列番号2：PCR用プライマー
配列番号3：PCR用プライマー
配列番号4：コリネバクテリウム グルタミカム由来のL-アミノ酸アミドハイドロラーゼのCD S配列
15 配列番号5：コリネバクテリウム グルタミカム由来のL-アミノ酸アミドハイドロラーゼのアミノ酸配列
配列番号6：プライマー
配列番号7：プライマー
配列番号8：プライマー
20

産業上の利用の可能性

本発明のジペプチドの製造方法により、複雑な合成方法を経ることなく、比較的安価に入手可能なL-アミノ酸アミドとL-アミノ酸を用いてジペプチドを製造することができ、医薬品素材、機能性食品等として有用なジペプチドの製造コストダウンが可能となる。また、本発明のジペプチドの製造方法によれば、様々な種類のL-アミノ酸アミドおよびL-アミノ酸を原料として、種々のタイプのジペプチドを生成することができる。また、本発明のL-アミノ酸アミドハイド

ローラーゼは、本発明のジペプチドの製造方法に好適に使用することができるものである。

請求の範囲

1. L-アミノ酸アミドハイドロラーゼ活性を有する酵素または酵素含有物を用いて、L-アミノ酸アミドおよびL-アミノ酸からジペプチドを製造することを特徴とするジペプチドの製造方法。
5
2. 前記酵素または酵素含有物が、L-アミノ酸アミドハイドロラーゼ活性を有する微生物の培養物、該培養物より分離した微生物菌体、および、該微生物の菌体処理物からなる群より選ばれる1種または2種以上であることを特徴とする
10 、請求の範囲第1項に記載のジペプチドの製造方法。
3. 前記微生物は、バチルス属、コリネバクテリウム属、エルビニア属、ロドコッカス属、クリセオバクテリウム属、ミクロコッカス属、シュードモナス属、クリプトコッカス属、トリコスポロン属、ロドスピリジウム属、スポロプロマイセス属、トレメラ属、トルラスピラ属、ステリグマトイセス属またはロドトルラ属に属することを特徴とする請求の範囲第2項に記載のジペプチドの製造方法
15 。
20
4. 前記酵素が、下記(A)または(B)のタンパク質である、請求の範囲第1項に記載のジペプチドの製造方法。
(A) 配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質
(B) 配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列を有し、かつ、L-アミノ酸アミドとL-アミノ酸からジペプチドを生成する反応を触媒するL-アミノ酸アミドハイドロラーゼ活性を有するタンパク質
25
5. 前記酵素が、下記(C)のDNAでコードされるタンパク質である、請求

の範囲第1項に記載のジペプチドの製造方法。

- (C) 配列表の配列番号4に記載の塩基番号57～1295の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジエントな条件でハイブリダイズし、かつL-アミノ酸アミドとL-アミノ酸からジペプチドを生成する反応を触媒するL-アミノ酸アミドハイドロラーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA

6. 前記微生物が、下記(A) (B) または(C) のタンパク質を発現可能に形質転換された微生物である、請求の範囲第2項に記載のジペプチドの製造方法

10 (A) 配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質

(B) 配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列を有し、かつ、L-アミノ酸アミドとL-アミノ酸からジペプチドを生成する反応を触媒するL-アミノ酸アミドハイドロラーゼ活性を有するタンパク質

15 (C) 配列表の配列番号4に記載の塩基番号57～1295の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジエントな条件でハイブリダイズし、かつL-アミノ酸アミドとL-アミノ酸からジペプチドを生成する反応を触媒するL-アミノ酸アミドハイドロラーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAでコードされるタンパク質

20 7. 前記L-アミノ酸アミドは、L-アラニンアミド、グリシンアミドおよびL-アスパラギン酸- α -アミドからなる群より選ばれる1種または2種以上であることを特徴とする請求の範囲第1項から第6項のいずれか1項に記載のジペプチドの製造方法。

25 8. 前記L-アミノ酸は、L-グルタミン、L-アスパラギン、グリシン、L

アラニン、L-バリン、L-ロイシン、L-イソロイシン、L-メチオニン、
 L-プロリン、L-フェニルアラニン、L-トリプトファン、L-セリン、L-
 スレオニン、L-チロシン、L-リジン、L-アルギニン、L-ヒスチジンおよ
 びL-グルタミン酸からなる群より選ばれる1種または2種以上であることを特
 徴とする請求の範囲第1項から第7項のいずれか1項に記載のジペプチドの製造
 方法。

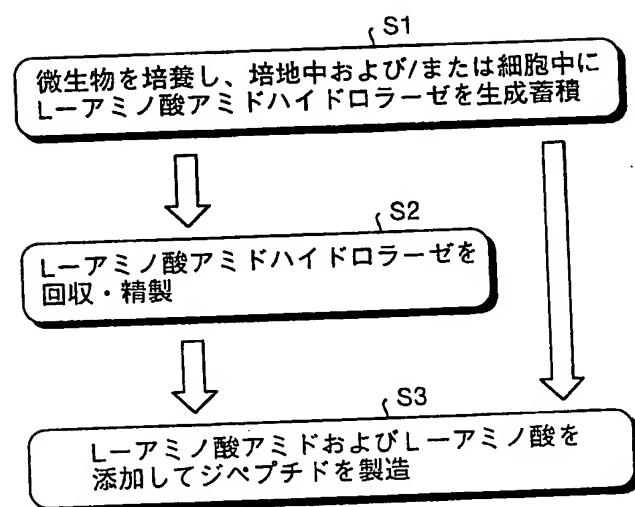
9. エルビニア属、ロドコッカス属、クリセオバクテリウム属、ミクロコッカ
 ス属、クリプトコッカス属、トリコスポロン属、ロドスピリジウム属、スポロブ
 ロマイセス属、トレメラ属、トルラスピラ属、ステリグマトイセス属またはロ
 ドトルラ属に属する微生物から得られ、かつ、L-アミノ酸アミドとL-アミノ
 酸からジペプチドを生成する反応を触媒することを特徴とするL-アミノ酸アミ
 ドハイドロラーゼ。

15 10. エルビニア属、ロドコッカス属、クリセオバクテリウム属、ミクロコッ
 カス属、クリプトコッカス属、トリコスポロン属、ロドスピリジウム属、スポロ
 マイセス属、トレメラ属、トルラスピラ属、ステリグマトイセス属または
 ロドトルラ属に属する微生物を培地中で培養し、培地中および/または細胞中に
 L-アミノ酸アミドとL-アミノ酸からジペプチドを生成する反応を触媒するL-
 20 -アミノ酸アミドハイドロラーゼを蓄積させることを特徴とするL-アミノ酸ア
 ミドハイドロラーゼの製造方法。

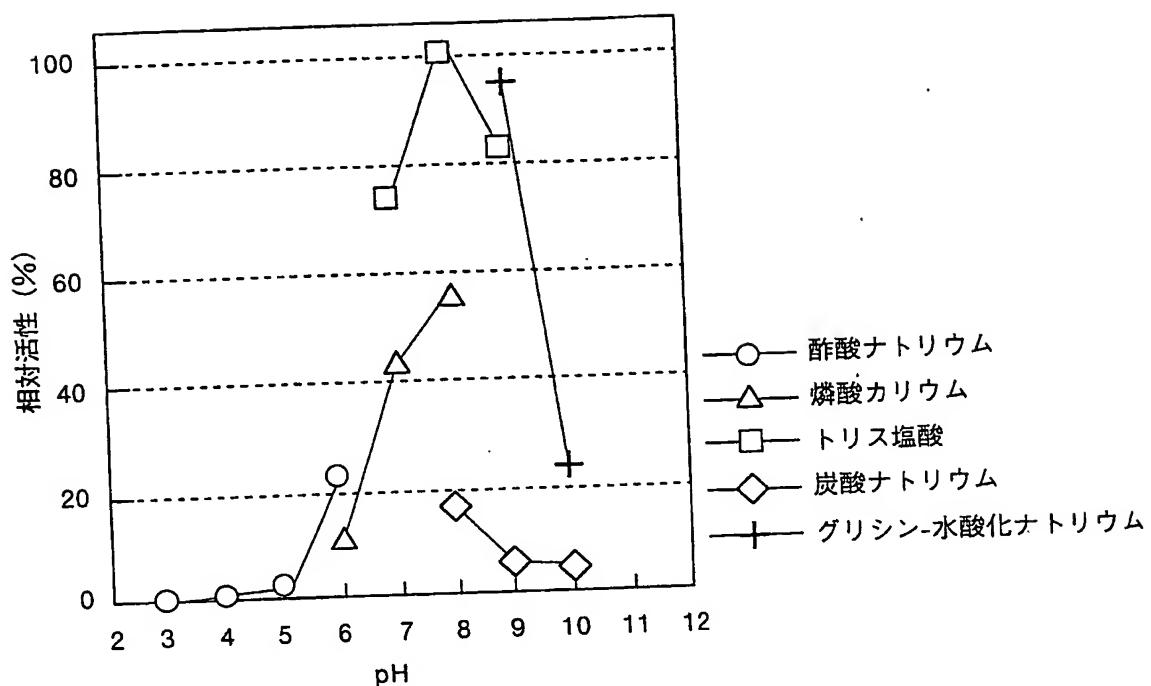
11. 下記(A) (B) または(C) のタンパク質を発現可能に形質転換され
 た微生物を培地中で培養し、培地中および/または細胞中にL-アミノ酸アミド
 25 とL-アミノ酸からジペプチドを生成する反応を触媒するL-アミノ酸アミドハ
 イドロラーゼを蓄積させることを特徴とするL-アミノ酸アミドハイドロラーゼ
 の製造方法。

- (A) 配列表の配列番号 5 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質
- (B) 配列表の配列番号 5 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列を有し、かつ、L-アミノ酸アミドとL-アミノ酸からジペプチドを生成する反応を触媒するL-アミノ酸アミドハイドロラーゼ活性を有するタンパク質
- 5 (C) 配列表の配列番号 4 に記載の塩基番号 57～1295 の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジエントな条件でハイブリダイズし、かつL-アミノ酸アミドとL-アミノ酸からジペプチドを生成する反応を触媒するL-アミノ酸アミドハイドロラーゼ活性を有するタンパク質をコードす
- 10 るDNAでコードされるタンパク質

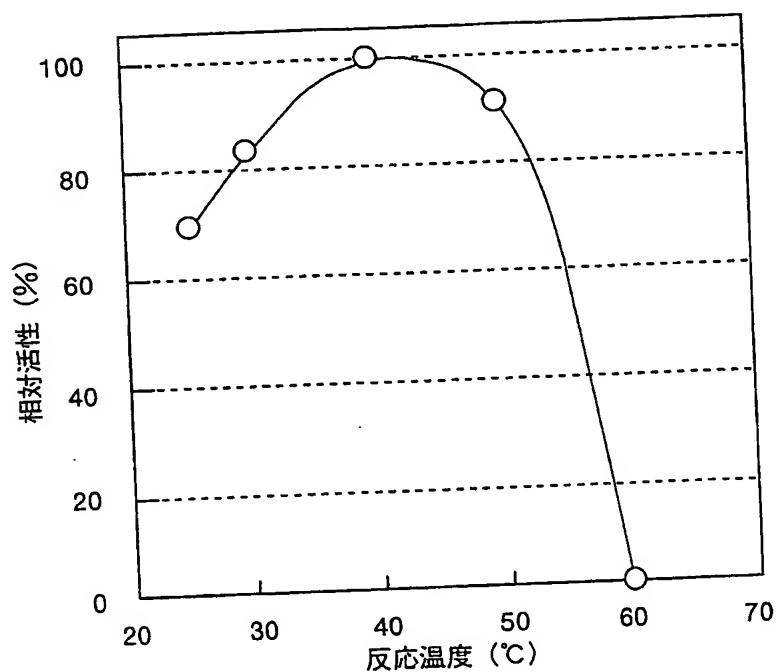
第1図



第2図



第3図



1/11

SEQUENCE LISTING

<110> 味の素株式会社 (Ajinomoto Co., Inc.)

<120> ジペプチドの製造方法、それに用いるL-アミノ酸アミドハイドロラーゼ、
および、L-アミノ酸アミドハイドロラーゼの製造方法

<130> PAMA-14170

<150> JP Patent Application 2001-226568

<151> 2001-07-26

<150> JP Patent Application 2001-310547

<151> 2001-10-05

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 30

<212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 1

Thr Lys Thr Leu Gly Ser Leu Gln Leu Glu Glu Ile Thr Leu Thr Leu

1

5

10

15

2/11

Pro Leu Thr Glu Asp Val Ala Asp Glu Xaa Arg Xaa Glu Xaa

20

25

30

<210> 2

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:cassette PCR

primer1

<400> 2

26

gghwsnytbc arytbgarga ratyac

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:cassette PCR

primer2

3/11

<400> 3

carytbarg aratyacbyt bacbytb

27

<210> 4

<211> 1307

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> CDS

<222> (57)..(1295)

<400> 4

ggcgagctcg ggcagtggtg ggggtggtgt ccaccctgc gcgtaacctg ggaagc atg 59
Met

1

act aaa aca ctt ggt tcc ctt caa ctt gaa gaa att acc ttg acg ctc 107
Thr Lys Thr Leu Gly Ser Leu Gln Leu Glu Glu Ile Thr Leu Thr Leu

5

10

15

cct ctg act gaa gat gtg gcc gat gaa cgc acc att gat gtg ttc gca 155
Pro Leu Thr Glu Asp Val Ala Asp Glu Arg Thr Ile Asp Val Phe Ala

20

25

30

cgc att gcc aca cgc gtc ggt ggg gaa gac ctt cca tat tta gta ttc 203

4/11

Arg Ile Ala Thr Arg Val Gly Gly Glu Asp Leu Pro Tyr Leu Val Phe

35

40

45

ctg cag ggt ggg cct ggc aat gaa gct cca cgt cca agc ctt aat ccc 251
Leu Gln Gly Gly Pro Gly Asn Glu Ala Pro Arg Pro Ser Leu Asn Pro

50

55

60

65

ctc aac ccc aat tgg ttg ggc gtg gcc ttg gag gaa tac cgc gtg gtc 299
Leu Asn Pro Asn Trp Leu Gly Val Ala Leu Glu Glu Tyr Arg Val Val
70 75 80

atg ttg gat caa cgt ggc acc ggc cgt tcc acc cca gtg ggt aat gat 347
Met Leu Asp Gln Arg Gly Thr Gly Arg Ser Thr Pro Val Gly Asn Asp
85 90 95

att ttg gaa aaa ccc aca gca gaa gta gtg gag tac tta tcc cac ctg 395
Ile Leu Glu Lys Pro Thr Ala Glu Val Val Glu Tyr Leu Ser His Leu
100 105 110

cgc gca gat ggc att gtg cga gat gct gaa gcc ctg cgt aag cat ttg 443
Arg Ala Asp Gly Ile Val Arg Asp Ala Glu Ala Leu Arg Lys His Leu
115 120 125

ggt gtg aat cag tgg aac ctt tta ggc cag tcc ttc gga ggt ttc acc 491
Gly Val Asn Gln Trp Asn Leu Leu Gly Gln Ser Phe Gly Gly Phe Thr
130 135 140 145

WO 03/010187

5/11

acc ctg cat tac ttg tcc cgg cac gcc gat tcc ttg gac aac gtg ttt 539
Thr Leu His Tyr Leu Ser Arg His Ala Asp Ser Leu Asp Asn Val Phe
150 155 160

att acc ggc ggt ctc agc gct att gat cgc cca gca gaa gac gtg tat 587
Ile Thr Gly Gly Leu Ser Ala Ile Asp Arg Pro Ala Glu Asp Val Tyr
165 170 175

gcc aac tgt tac aac cgc atg cgc cga aac tct gag gaa ttc tac cgt 635
Ala Asn Cys Tyr Asn Arg Met Arg Arg Asn Ser Glu Glu Phe Tyr Arg
180 185 190

cgc ttc ccg caa tta cgg gaa act ttc cga ggg ttg gtt aat cgt gct 683
Arg Phe Pro Gln Leu Arg Glu Thr Phe Arg Gly Leu Val Asn Arg Ala
195 200 205

cgc gcc ggg gag att gtg ctt ccc acc ggc gaa gtt gtg tca gaa acc 731
Arg Ala Gly Glu Ile Val Leu Pro Thr Gly Glu Val Val Ser Glu Thr
210 215 220 225

agg ctg cga tcc ctt ggt cac ttg ttg ggt agc aat gac ggc tgg ttt 779
Arg Leu Arg Ser Leu Gly His Leu Leu Gly Ser Asn Asp Gly Trp Phe
230 235 240

gat ctg tac aac ctg ctg gaa tta gat ccc acc tcc aac gct ttt gtc 827
Asp Leu Tyr Asn Leu Leu Glu Leu Asp Pro Thr Ser Asn Ala Phe Val
245 250 255

WO 03/010187

6/11

cat gac ctg gca gga ctt ttg cct ttc ggc aac cgc aac cca att tat 875

His Asp Leu Ala Gly Leu Leu Pro Phe Gly Asn Arg Asn Pro Ile Tyr

260

265

270

tac gtg ctc cat gag tcc tct tac gcc gac ggt gtg gtg aca aat tgg 923

Tyr Val Leu His Glu Ser Ser Tyr Ala Asp Gly Val Val Thr Asn Trp

275

280

285

gca gca gag cgt gtg ctt cca gag gat ttc cgc gag gat cca aca ctg 971

Ala Ala Glu Arg Val Leu Pro Glu Asp Phe Arg Glu Asp Pro Thr Leu

290

295

300

305

ctc acc ggt gag cac gtg ttc cag gag tgg aca gac acc gtg ccg tcg 1019

Leu Thr Gly Glu His Val Phe Gln Glu Trp Thr Asp Thr Val Pro Ser

310

315

320

ctc aag ccg tgg aag gac gtt gcc ctg gca ttg gct cag cag gaa tgg 1067

Leu Lys Pro Trp Lys Asp Val Ala Leu Ala Gln Gln Glu Trp

325

330

335

ccc aag ctt tat gat gcg aag gca ttg gaa aac tca cag gcc aag ggc 1115

Pro Lys Leu Tyr Asp Ala Lys Ala Leu Glu Asn Ser Gln Ala Lys Gly

340

345

350

gct gca gca gtg tat gac gtt ttc gtc cca gtg gat tac tct 1163

Ala Ala Ala Val Tyr Xaa Asn Asp Val Phe Val Pro Val Asp Tyr Ser

WO 03/010187

7/11

355

360

365

ctg gaa acc gca caa cac ctg ccc ggt gtg cag ctg ttt atc acc agc 1211
 Leu Glu Thr Ala Gln His Leu Pro Gly Val Gln Leu Phe Ile Thr Ser

370

375

380

385

cag cat gaa cac aat gga ctt cgt gcc agc tca ggc gca gta ctg rag 1259
 Gln His Glu His Asn Gly Leu Arg Ala Ser Ser Gly Ala Val Leu Xaa

390

395

400

cac ctt ttc gat ctg gcc cac ggc cga gag gta cgc tgagggcccc cg 1307
 His Leu Phe Asp Leu Ala His Gly Arg Glu Val Arg

405

410

<210> 5

<211> 413

<212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 5

Met Thr Lys Thr Leu Gly Ser Leu Gln Leu Glu Glu Ile Thr Leu Thr

1

5

10

15

Leu Pro Leu Thr Glu Asp Val Ala Asp Glu Arg Thr Ile Asp Val Phe

20

25

30

WO 03/010187

8/11

Ala Arg Ile Ala Thr Arg Val Gly Gly Glu Asp Leu Pro Tyr Leu Val

35 40 45

Phe Leu Gln Gly Gly Pro Gly Asn Glu Ala Pro Arg Pro Ser Leu Asn

50 55 60

Pro Leu Asn Pro Asn Trp Leu Gly Val Ala Leu Glu Glu Tyr Arg Val

65 70 75 80

Val Met Leu Asp Gln Arg Gly Thr Gly Arg Ser Thr Pro Val Gly Asn

85 90 95

Asp Ile Leu Glu Lys Pro Thr Ala Glu Val Val Glu Tyr Leu Ser His

100 105 110

Leu Arg Ala Asp Gly Ile Val Arg Asp Ala Glu Ala Leu Arg Lys His

115 120 125

Leu Gly Val Asn Gln Trp Asn Leu Leu Gly Gln Ser Phe Gly Gly Phe

130 135 140

Thr Thr Leu His Tyr Leu Ser Arg His Ala Asp Ser Leu Asp Asn Val

145 150 155 160

Phe Ile Thr Gly Gly Leu Ser Ala Ile Asp Arg Pro Ala Glu Asp Val

165 170 175

WO 03/010187

9/11

Tyr Ala Asn Cys Tyr Asn Arg Met Arg Arg Asn Ser Glu Glu Phe Tyr

180

185

190

Arg Arg Phe Pro Gln Leu Arg Glu Thr Phe Arg Gly Leu Val Asn Arg

195

200

205

Ala Arg Ala Gly Glu Ile Val Leu Pro Thr Gly Glu Val Val Ser Glu

210

215

220

Thr Arg Leu Arg Ser Leu Gly His Leu Leu Gly Ser Asn Asp Gly Trp

225

230

235

240

Phe Asp Leu Tyr Asn Leu Leu Glu Leu Asp Pro Thr Ser Asn Ala Phe

245

250

255

Val His Asp Leu Ala Gly Leu Leu Pro Phe Gly Asn Arg Asn Pro Ile

260

265

270

Tyr Tyr Val Leu His Glu Ser Ser Tyr Ala Asp Gly Val Val Thr Asn

275

280

285

Trp Ala Ala Glu Arg Val Leu Pro Glu Asp Phe Arg Glu Asp Pro Thr

290

295

300

Leu Leu Thr Gly Glu His Val Phe Gln Glu Trp Thr Asp Thr Val Pro

305

310

315

320

WO 03/010187

10/11

Ser Leu Lys Pro Trp Lys Asp Val Ala Leu Ala Leu Ala Gln Gln Glu
285 330 335

Trp Pro Lys Leu Tyr Asp Ala Lys Ala Leu Glu Asn Ser Gln Ala Lys
 340 345 350

Gly Ala Ala Ala Val Tyr Xaa Asn Asp Val Phe Val Pro Val Asp Tyr
 355 360 365

Ser Leu Glu Thr Ala Gln His Leu Pro Gly Val Gln Leu Phe Ile Thr
 370 375 380

Ser Gln His Glu His Asn Gly Leu Arg Ala Ser Ser Gly Ala Val Leu
385 390 395 400

Xaa His Leu Phe Asp Leu Ala His Gly Arg Glu Val Arg
405 410

<210> 6

<211> 30

· <212> DNA

<213> Artificial Sequence

220

<223> Description of Artificial Sequence:primer

WO 03/010187

11/11

<400> 6

ggcgagctcg ggcagtggtg ggggtggtgt

30

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 7

cggggggccct cagcgtacct ctccggccgtg

30

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 8

ggcgagctca tgactaaaac acttggttcc

30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP02/07633

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl' C07K1/02, 5/06, C12P21/00, 21/02, C12N9/48, 15/57

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl' C07K1/02, 5/06, C12P21/00, 21/02, C12N9/48, 15/57

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS/WPI (DIALOG), JICST FILE (JOIS), SwissProt/PIR/GeneSeq,
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SCHWARZ, A. et al., A two-step enzymatic synthesis of dipeptides. Biotechnology and Bioengineering. 20 January, 1992 (20.01.92), Vol.39, No.2, pages 132 to 140	1-11
A	EP 1108790 A2 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 20 June, 2001 (20.06.01), Particularly, page 69, SEQ NOS.657, 4157 & JP 2002-191370 A	1-11
A	WO 01/00842 A2 (BASF AG), 04 January, 2001 (04.01.01), Particularly, page 136, SEQ NO.96 (Family: none)	1-11

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
12 November, 2002 (12.11.02)

Date of mailing of the international search report
26 November, 2002 (26.11.02)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int. Cl' C07K1/02, 5/06, C12P21/00, 21/02, C12N9/48, 15/57

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int. Cl' C07K1/02, 5/06, C12P21/00, 21/02, C12N9/48, 15/57

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

BIOSIS/WPI(DIALOG), JICSTファイル(JOIS), SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	SCHWARZ, A., et al., A two-step enzymatic synthesis of dipeptides. Biotechnology and Bioengineering. 1992.01.20, vol. 39, no. 2, p. 132-140	1-11
A	EP 1108790 A2 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.) 2001.06.20 特に第69頁のSEQ NO. 657及びSEQ NO. 4157を参照 &JP 2002-191370 A	1-11

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12. 11. 02

国際調査報告の発送日

26.11.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

小暮 道明



4B 9358

電話番号 03-3581-1101 内線 3448